Aus der Kinderklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. J. R. Bierich
und der Frauenklinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. A. Hirsch

Die Bedeutung des Elektrophorese-Mobilitäts-(EM-) Testes für die Differentialdiagnose des Mammacarcinoms

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Kurt Klaissle
aus Freudenstadt

1981

Aus der Kinderklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. J. R. Bierich
und der Frauenklinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. A. Hirsch

Die Bedeutung des Elektrophorese-Mobilitäts-(EM-) Testes für die Differentialdiagnose des Mammacarcinoms

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Kurt Klaissle
aus Freudenstadt

1981

Dekan:	Professor Dr. G. Rassner
1. Berichterstatter:	Professor Dr. D. Niethammer
2. Berichterstatter:	Professor Dr. H. A. Hirsch

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

REFO-DRUCK HANS VOGLER TÜBINGEN

Meinen Eltern und meiner Frau

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I	Einleitung	1
II	Material und Methode	4
	1. Prinzip des EM-Testes	4
	2. Lymphocytenisolierung	5
	3. Antigen	6
	4. Indikatorzellen	6
	5. Testansatz und Nullstandard	7
	6. Schematische Darstellung der Arbeitsschritte	9
	7. Zellelektrophorese	10
	7.1 Prinzip der zytopherometrischen Messung	10
	7.2 Aufbau des Zytopherometers	10
	7.3 Messvorgang	11
	8. Auswertung	13
III	Ergebnisse	14
	1. Patientengut	14
	2. Messwerte und statistische Kenngrößen	15
	3. Erläuterungen zu den Messwerten	21
	4. Schaubilder	23
IV	Diskussion	26
	1. Entwicklung der Methode	26
	2. Interpretation der Ergebnisse	27
	3. Technische Probleme bei der Durchführung der zytopherometrischen Messung	31
	4. Vergleich mit der Treffsicherheit anderer diagnostischer Methoden	31
	5. Schlußbemerkungen	33
V	Zusammenfassung	34
VI	Quellenverzeichnis	35
	Lebenslauf	
	Dank	

I Einleitung

Das Mammacarcinom ist in den Ländern der westlichen Welt zum häufigsten malignen Tumor der Frau geworden. Während im Jahre 1957 das Mammacarcinom in Hamburg mit einem Anteil von 16 % an allen malignen Erkrankungen der Frau noch an zweiter Stelle hinter dem Collumcarcinom (22%) stand, befand es sich 1965 mit 18 % an erster Stelle (Collumcarcinom 12%) (35). Daß es sich dabei nicht um eine geographisch begrenzte Entwicklung oder um eine relative Zunahme handelt, zeigen die Zahlen der Bundesstatistik der BRD, die von 1932-1961 eine Zunahme der standardisierten Mortalität am Mammacarcinom um 40 % aufzeigen (48).

Betrachtet man die Therapieergebnisse, so darf man feststellen, daß Fortschritte in der Behandlung des Mammacarcinoms erzielt worden sind und diese möglicherweise auf verschiedene Behandlungsmethoden zurückzuführen sind (19,25).
Doch bei genauer Untersuchung erweisen sich die Unterschiede in den Erfolgsziffern der verschiedenen therapeutischen Methoden als Funktion des Anteils der frühdiagnostizierten Fälle. Das wird ersichtlich aus einer Studie von Benninghoff und Tsien, die die absoluten 5-Jahresüberlebenszahlen aus 15 Kliniken, in denen ganz verschiedene Behandlungsverfahren angewendet wurden, mit dem prozentualen Anteil der operablen Fälle im Krankengut jeder dieser Kliniken verglichen. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß das beste Resultat nicht durch die radikalste Behandlung, sondern durch die strengste Selektion erreicht wurde (2).

Eine Gegenüberstellung der Therapieergebnisse der gebräuchlichsten Behandlungsmethoden bei gleichem Tumorstadium durch Haagensen und Cooley zeigt, daß in den Überlebensraten nach 5 bzw. 10 Jahren kein wesentlicher Unterschied vorhanden ist (17). Zu ähnlichen

Ergebnissen kommt McWhirter in seiner Studie über die simultanvergleichende Reihenbeobachtung von verschiedenartig behandelten Frauen mit Mammacarcinom (26).

Vielmehr ist bei den derzeitigen therapeutischen Möglichkeiten die Prognose des Mammacarcinoms abhängig vom Zeitpunkt der Diagnosestellung und vom Ausbreitungsgrad des Malignoms (40). Es sinkt die 5-Jahresüberlebensrate um 30-50 % bei Ausbreitung des Carcinoms in die regionären Lymphknoten (19,24,48).
Wenn man dazu noch in Betracht zieht, daß der überwiegende Teil der Mammacarcinome von den Patientinnen selbst entdeckt wird (19) und sich die Carcinome zu diesem Zeitpunkt meist schon in einem fortgeschrittenen Stadium befinden, so ergibt sich daraus die Bedeutung der Früherkennung des Mammacarcinoms und damit die Notwendigkeit, Untersuchungsverfahren zur Verfügung zu haben, die in der Lage sind, klinisch kaum nachweisbare Malignome zu diagnostizieren.
Für die Erkennung des Mammacarcinoms stehen in der Routinediagnostik neben den klinischen Methoden der Untersuchung eine Reihe anderer Verfahren wie z.B. die Mammographie, die Thermographie und als invasive Methode die Punktion mit anschließender histologischer Untersuchung zur Verfügung.
Nachdem durch die immunologische Forschung Erkenntnisse über die Rolle der Lymphocyten bei der Malignomabwehr gewonnen wurden, haben auch immunologische Untersuchungsmethoden Bedeutung auf dem Gebiet der Tumordiagnostik gewonnen (7,29).

Es gilt als erwiesen, daß die Lymphocyten (T-Lymphocyten) von Malignomträgern auf Grund der antigenen Sensibilisierung durch das Malignom eine definierte Prägung erfahren.
Nach Erhalt dieser Prägung setzen die Lymphocyten bei erneutem Kontakt mit dem Antigen eine Reihe von Faktoren, die sog. Lymphokine

frei. Diese Lymphokine werden von den spezifisch sensibilisierten Lymphocyten bei Antigen-Kontakt auch in vitro freigesetzt und können indirekt über ein Indikatorzellsystem nachgewiesen werden.
Der Elektrophorese-Mobilitätstest (EM-Test) beruht auf dem Nachweis eines solchen Lymphokins (6,7).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den EM-Test auf seine Wertigkeit bei der Diagnose des Mammacarcinoms zu untersuchen und einen Vergleich mit den Ergebnissen jener Untersuchungsmethoden vorzunehmen, die zur Zeit eine breite Anwendung bei der Erkennung des Mammacarcinoms finden. Dazu zählen mit einer Treffsicherheit zwischen 62-88 % richtig diagnostizierter Carcinome die Inspektion und Palpation, mit einem Ergebnis zwischen 69-92 % die Mammographie und zwischen 55-80 % die Thermographie (38). Eine fast 100 %ige Treffsicherheit wird mit der Excisionsbiopsie erreicht (41).

II Material und Methode

II.1 Prinzip des EM-Testes

Spezifisch sensibilisierte Lymphocyten setzen auf erneuten Kontakt mit dem sensibilisierenden Antigen eine Anzahl von Faktoren frei. Der bekannteste Faktor ist der Makrophagen-Inhibitionsfaktor (MIF), der für das Haften der Makrophagen am Antigenort sorgt. Auch die sensibilisierten Lymphocyten von Malignomträgern geben solche Faktoren ab.

Caspary und Field fanden bei ihren Untersuchungen einen Faktor, der aus Lymphocyten von Malignomträgern nach Kontakt mit einem aus menschlichem Gehirn gewonnenen basischen Myelinprotein (EF = encephalitogener Faktor) freigesetzt wurde (6,7). Dieser Faktor, der Makrophagen-Slowing-Faktor (MSF), verlangsamte die Wandrungsgeschwindigkeit der als Indikatoren verwendeten Makrophagen im elektrischen Feld. Eine notwendige Voraussetzung für den Nachweis des MSF wurde von Caspary und Field in der Verwendung von lebenden Zellen als Indikatoren gesehen (4).

Eine Reihe von Autoren arbeiteten mit dieser Methode und bestätigten die von Caspary und Field berichteten Ergebnisse (16,33). Die Aufwendigkeit des Verfahrens und die lange Einarbeitungszeit verhinderten aber die weitere Verbreitung des EM-Testes. Der von Porzsolt et al. eingeführte Ersatz der Makrophagen durch tannierte und Sulphosalizylsäure stabilisierte Schafserythrocyten (ETS) brachte eine wesentliche Vereinfachung des Testverfahrens (30). Bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit fand dieses modifizierte Verfahren Anwendung.

II.2 Lymphocytenisolierung

Durch den Zusatz von 100 I.E. Heparin werden 20 ml venöses Blut ungerinnbar gemacht und mit einem Zusatz von 2 ml Macrodex[1] versehen. Macrodex bewirkt eine beschleunigte Sedimentation der Erythrocyten. Anschließend wird die Probe für 60 Minuten bei 37 Grad Celsius inkubiert. Der leukocytenreiche Plasmaüberstand wird auf 15 ml Ficoll-Lösung[2] (s.u.) geschichtet und 40 Minuten bei 1200 U/sec zentrifugiert. Bei der Zentrifugation werden die einzelnen Zellpopulationen auf Grund der unterschiedlichen Dichte voneinander getrennt. Die Erythrocyten und die Granulocyten sinken in die Ficoll-Lösung ab, während sich die Lymphocyten als weißlich-trübes Band zwischen Ficoll-Lösung und darüber befindlichem Plasma sammeln.

Die aus der Interphase gewonnenen Lymphocyten werden dreimal in Hanks balanced salt solution (HBSS)[3] gewaschen und anschließend mit RPMI - Medium 1640[4] in der Weise resuspendiert, daß sich in 1 ml jeweils 5×10^6 Lymphocyten befinden.

Der Vitalitätsnachweis, der nach 24-stündiger Inkubation der Lymphocyten mit Hilfe des Trypanblau-Testes geführt wurde, ergab eine Überlebensrate von 91-94 %.

Ficoll-Ansatz: 9,24 g Ficoll^R, 119,4 ml Aqua dest. und 1 Ampulle (25 ml) Urovison[5] wurden 60 Minuten mit dem Magnetrührer gerührt.

[1] Macrodex^R (Dextran 6 % in physiol. NaCl-Lösung; Knoll AG, Ludwigshafen)

[2] Ficoll^R (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden)

[3] HBSS^R (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA)

[4] RPMI^R (Microbiological Associates, Bethesda, Maryland, USA)

[5] Urovison^R (Schering AG)

II.3 Antigen

Die Lymphocyten werden mit einem aus menschlichem Gehirn gewonnenen basischen Myelinprotein, dem encephalitogenen Faktor (EF), stimuliert. Gewonnen wird der EF nach den Vorschriften von Caspary und Field: Homogenisierung des Gewebes, Entfernung der Lipide mit Hilfe einer Chloroform-Methanol-Mischung und Gewinnung des Proteins durch HCl-Extraktion aus dem entfetteten Rest (5).
Der EF wird in dem Test verwendet, da nach den Ergebnissen von Caspary und Field sowohl die Lymphocyten von Patienten mit degenerativen Nervenerkrankungen und einigen Autoimmunerkrankungen als auch die Lymphocyten von Malignomträgern gegen das basische Myelinprotein sensibilisert sind (10). Der EM-Test findet daher mit diesem Antigen nicht nur im Bereich der Carcinomdiagnostik, sondern u.a. auch in der Untersuchung der Multiplen Sklerose, der Sarkoidose und des Lupus erythematodes Anwendung (14).
In der vorliegenden Arbeit wurde für den Testansatz eine Lösung von 0,3 mg EF/ml HBSS hergestellt.
Der EF wurde mir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. W. Ax, Behring-Institut, Marburg überlassen.

II.4 Indikatorzellen

Zum indirekten Nachweis des durch die Lymphocyten gebildeten Lymphokins mittels der Zellelektrophorese werden tannierte durch Sulphosalizylsäure stabilisierte Schafserythrocyten (ETS) verwendet.
Durch den Einsatz dieser Schafserythrocyten durch Porzsolt et al. als Indikatorzellen an Stelle der vorher verwendeten Meerschweinchenmakrophagen hat der Test eine wesentliche Vereinfachung er-

fahren (30). Die Schafserythrocyten stellen eine besonders geeignete Zellart dar, sowohl was das elektrostatische Verhalten als auch was die Fähigkeit zur Anlagerung von Substanzen betrifft. Die verbesserte Adsorption von Substanzen ist auf die Behandlung mit Tannin zurückzuführen (21). Durch die Stabilisierung mit Sulphosalizylsäure sind die Erythrocyten für mehrere Monate haltbar (1).

Für den Testansatz wurde eine Suspension von 5×10^7 ETS/ml HBSS hergestellt.

Die ETS-Indikatorzellen wurden mir freundlicherweise vom Behring-Institut in Marburg überlassen.

II.5 Testansatz und Nullstandard

Zur antigenen Stimulierung werden 1 ml Lymphocytensuspension (5×10^6 Lymphocyten/ml Medium) mit 3 ml EF-Lösung (0,3 mg EF/ml HBSS) vermischt und für 24 Stunden bei 37 Grad Celsius inkubiert.

Danach werden die Lymphocyten mit 1000 U/min abzentrifugiert. Sofern die Lymphocyten gegen den EF sensibilisiert waren, soll der Überstand den von den Lymphocyten gebildeten Mediator enthalten. Von dem Überstand werden 3 ml abpipettiert und mit 1 ml der ETS-Indikatorzellsuspension vermischt. Der Ansatz wird für 90 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert, anschließend wird die Wanderungsgeschwindigkeit der Indikatorzellen im Zytopherometer bestimmt.

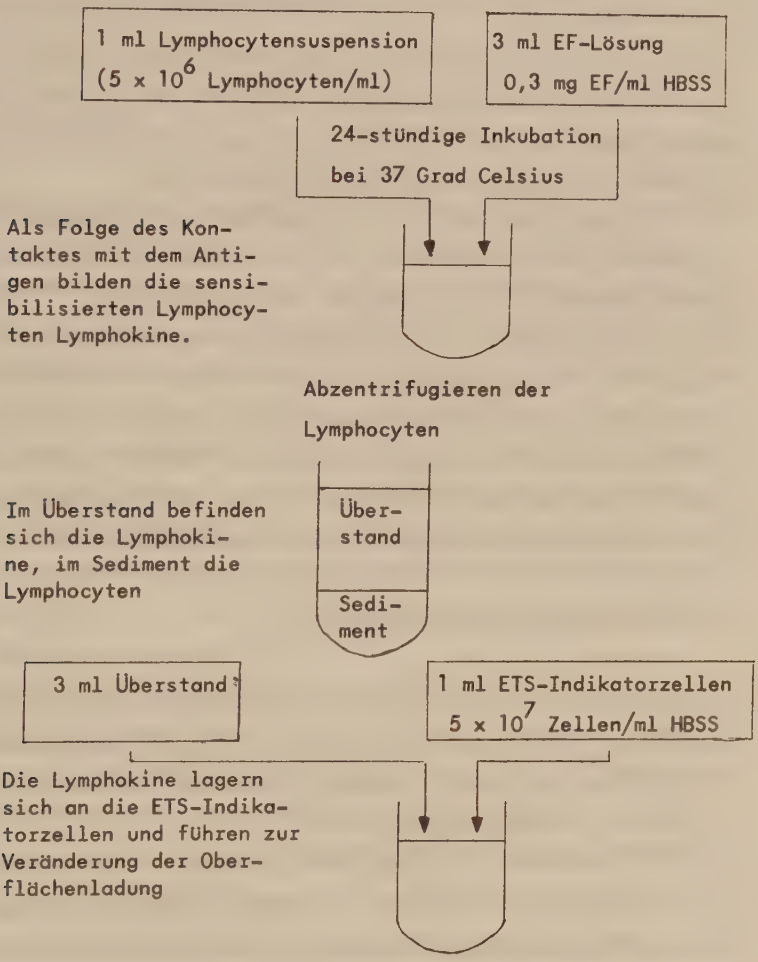
Als Vergleichsgröße für die Bestimmung der Migrationshemmung dient der Nullstandard nach Porzsolt et al. (30,31). Eine Mischung bestehend aus 1 ml ETS-Indikatorzellsuspension, 2 ml HBSS und 1 ml RPMI werden ebenfalls für 90 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert, dann wird die Migrationsgeschwindigkeit im Zytophero-

meter bestimmt.

Die Schwankungen in der Migrationszeit des Nullstandards sind gering, allerdings wird mit zunehmender Lagerungsdauer der ETS-Indikatorzellen eine Verlangsamung der Wanderungsgeschwindigkeit beobachtet.

Für die Untersuchungsreihe eines Tages wird jeweils nur ein Nullstandard bestimmt.

II.6 Schematische Darstellung der Arbeitsschritte bei der Durchführung des EM-Testes:



II.7 Zellelektrophorese

II.7.1 Prinzip der Zytopherometrischen Messung

Das Prinzip der Zytopherometrischen Messung beruht darauf, daß sich in einer Elektrolytlösung suspendierte und mit einer Überschußladung versehene Partikel bei Anlegung eines Gleichstromes in Richtung auf den entsprechenden Pol bewegen.
Wird die Überschußladung durch Adsorption einer entgegengesetzt geladenen Substanz vermindert, so verlangsamt sich die Wanderungsgeschwindigkeit des Partikels im elektrischen Feld.
Die Verminderung der - im physiologischen Milieu gewöhnlich negativen - Überschußladung der Indikatorzelle wird im EM-Test auf die Adsorption des durch die Lymphocyten gebildeten Lymphokins an die Indikatorzellmembran zurückgeführt (30,31). Die veränderte Oberflächenladung der Indikatorzelle kann im Zytopherometer über die Verlangsamung der Migrationszeit nachgewiesen werden.

II.7.2 Aufbau des Zytopherometers

Das Zytopherometer der Fa. Zeiss, Oberkochen besteht im wesentlichen aus einer temperierten Meßkammer, in die die zu messende Indikatorzellsuspension eingebracht wird, und aus zwei Elektroden, an die ein Gleichstrom gelegt wird.
Auf die Meßkammer ist ein Mikroskop gerichtet. Durch ein im Okular befindliches Raster läßt sich die Wanderungszeit der Indikatorzellen für eine konstante Strecke bestimmen. Die Meßkammer befindet sich im Innern einer Temperierkammer und diese wird mit einer Genauigkeit von $\pm$ 0,5 Grad Celsius auf einer Temperatur von 23 Grad Celsius gehalten. An die beiden Platinelektroden, die über T-Stücke mit der Meßkammer in Verbindung stehen, wird ein

Gleichstrom gelegt. Über ein Gleichrichtergerät werden die Elektroden mit Strom konstanter Spannung versorgt. Die Änderung der Stromrichtung ist durch einen angeschlossenen Kabelschalter möglich.

II.7.3 Meßvorgang

Die Messung mit dem Zytopherometer wird bei einer Stromstärke von 6,5 mA und einer Spannung von 150 V vorgenommen. Die Temperatur der Meßkammer beträgt 23 Grad Celsius. Die Indikatorzellsuspension muß frei von Luftblasen in die Meßkammer eingebracht werden, dann wird die Messung der Wanderungszeit nach einer 10 minütigen Wartefrist in der vorderen stationären Ebene der Kammer vorgenommen. Diese Ebene wird gewählt, weil lediglich an dieser Stelle keine Flüssigkeitsströmungen bestehen, so daß hier die elektrophoretische Beweglichkeit der Indikatorzellen unbeeinflußt bleibt. In der übrigen Kammer führt die Aufschwemmflüssigkeit beim Einschalten des Stromes infolge Elektrodenosmose einen Doppelkreislauf in der rektangulären Kammer durch (47).
Nach Anlegen der Spannung wird mit einer Stoppuhr die Zeit gemessen, in der eine Zelle eine Rastereinheit durchläuft, dann wird die Stromrichtung umgepolt und die Zeit für die Passage derselben Rastereinheit in gegenläufiger Richtung bestimmt. Dieser Meßvorgang wird bei 10 verschiedenen Indikatorzellen durchgeführt.

Die Meßwerte für die Passage einer Zelle sind auf Grund von Turbulenzen selten für beide Richtungen gleich groß. Caspary und Field sehen die Ursache für die Turbulenzen in Mikrolecks an den Elektrodenmembranen und an den Schlauchverbindungen zwischen Meßkammern und Elektroden (11).
Preece und Light beobachteten beim Einschalten des Stromes eine

Erwärmung der Meßkammer und als Folge davon das Auftreten von Konvektionsströmungen. Diese Strömungen waren sowohl parallel als auch rechtwinklig zur Meßkammerachse gerichtet (32).
Trotz der 10 minütigen Wartezeit nach Einbringen der Indikatorzellösung waren die Turbulenzen insbesondere in Richtung der Meßkammerachse häufig so groß, daß erst nach mehrmaligem Einfüllen der Meßlösung ein verwertbares Ergebnis erzielt werden konnte. Toleriert wurde ein Unterschied von bis zu 10 % in den beiden Wanderungszeiten einer Zelle.
Auf Grund der meist vorhandenen Unterschiede der in beiden Richtungen gemessenen Zeiten, wird zur Berechnung der Wanderungszeit nicht das arithmetische Mittel, sondern nach Porzsolt et al. (30) das harmonische Mittel herangezogen.

Dazu werden folgende Zeiten gemessen:
a= Wanderungszeit für eine Richtung
b= Wanderungszeit für beide Richtungen zusammen
folglich ist a= t_1 und (b-a)= t_2
t sei die tatsächliche Wanderungszeit

$$\text{Harmonisches Mittel } M_h = \frac{n}{\frac{1}{x_1} + \frac{1}{x_2} \ldots + \frac{1}{x_n}} = \frac{2}{\frac{1}{t_1} + \frac{1}{t_2}}$$

Daraus ergibt sich die

$$\text{tatsächliche Wanderungszeit } t = \frac{2t_1\, t_2}{t_1 + t_2} = \frac{2a\,(b-a)}{b}$$

II.8 Auswertung

Bei jedem Nullstandard und bei jeder Probe wird die Wanderungszeit von zehn Indikatorzellen gemessen. Aus dem harmonischen Mittelwert der Wanderungszeit des Nullstandards t_o und dem der jeweiligen Probe t_p wird mit nachstehender Formel die Hemmung der Wanderungsgeschwindigkeit in Prozent ausgerechnet.

$$\text{Hemmung in \%} = 100 \frac{t_p - t_o}{t_p}$$

t_p = harm. Mittelwert der Wanderungszeiten der Probe

t_o = harm. Mittelwert der Wanderungszeiten des Nullstandards

III Ergebnisse

III.1 Patientengut

Zur Untersuchung kamen die Lymphocyten von 25 Kontrollpersonen, von 25 Patientinnen mit benignen Tumoren und von 20 Patientinnen mit malignen Tumoren. Die Gruppe der Kontrollpersonen bestand aus 13 Gesunden, darunter 3 Männern, und aus 12 Patientinnen mit verschiedenen gutartigen gynäkologischen Erkrankungen. Die Diagnose der benignen und malignen Erkrankungen der Mamma wurde in allen Fällen histologisch gesichert. Das Blut wurde in der Regel 1-3 Tage von der Operation und - sofern eine nachoperative Messung durchgeführt wurde - 3-6 Tage nach der Operation abgenommen.

III.2 Messwerte und statistische Kenngrößen

A) KONTROLLPERSONEN

Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose	% Hemmung
1	23	w	Gesunde Kontrollperson	+ 2,8
2	23	w	"	+ 5,8
3	35	w	"	+ 3,1
4	48	w	"	+ 1,0
5	21	w	"	+ 1,6
6	33	w	"	0,0
7	31	w	"	- 2,2
8	23	w	"	+ 16,2
9	27	w	"	+ 0,4
10	26	m	"	+ 3,9
11	32	m	"	+ 1,3
12	32	m	"	+ 8,3
13	42	w	"	+ 10,7
14	51	w	Desc. genit.	+ 8,3
15	33	w	Ut. myom.	- 2,5
16	53	w	Desc. vag. et ut. Ut. myom.	+ 10,6
17	56	w	Desc. ut. mit Harninkontinenz	+ 1,2
18	36	w	Sek. Sterilität	+ 6,0
19	49	w	Desc. vag. et ut.	+ 5,0
20	50	w	Desc. vag. et ut.	+ 6,5

III.2 Messwerte und statistische Kenngrößen

A) KONTROLLPERSONEN

Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose	% Hemmung
21	50	w	Stressinkontinenz	- 0,2
22	40	w	Desc. vag. et ut.	+ 3,8
23	50	w	Ut. myom., Zystocele, Knötchen in der Vagina, klimakt. Beschwerden	+ 22,9
24	55	w	Desc. vag. et ut	+ 4,6
25	46	w	Desc. vag. et ut.	+ 8,5

Statistische Kenngrößen:

Zahl der Messungen: $n = 25$

Arithmetisches Mittel: $\bar{x} = 5{,}1\ \%$

Standardabweichung: $1 = \pm 5{,}7$

B) BENIGNE ERKRANKUNGEN DER MAMMA

Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose	% Hemmung praeoperativ/postoperativ	
1	34	w	Fibroadenom	+ 2,1	
2	46	w	Fibrocystische Mastopathie, Prechtel I	+ 4,8	
3	45	w	Cyst. Mastopathie, Prechtel I	+ 6,5	
4	70	w	Mastop. Prechtel I Corpus Ca. 1960	+ 8,6	
5	46	w	Cyst. Mastopathie, Prechtel I	- 7,5	
6	50	w	Cyst. Mastopathie, Prechtel II	+ 13,7	
7	40	w	Cyst. Mastopathie, Prechtel I	+ 6,5	
8	56	w	Cyst. Mastopathie, Prechtel I	- 0,4	
9	40	w	Fibroadenoma intracaniculare	+ 5,1	
10	78	w	Cyst. Mastopathie, Prechtel I	+ 7,0	
11	43	w	Cyst. Mastopathie, Prechtel I	+ 7,5	
12	62	w	Fibrom	- 1,4	
13	47	w	Cyst. Mastopathie, Prechtel I	+ 10,0	+ 6,4
14	56	w	Fibrom	+ 0,4	+ 1,2
15	32	w	Fibrocystische Mastopathie, Prechtel I	+ 2,7	+ 3,9
16	68	w	Fibrocystische Mastopathie, Prechtel I	+ 3,9	+ 11,1
17	24	w	Fibroadenom	+ 1,9	+ 5,6

B) BENIGNE ERKRANKUNGEN DER MAMMA

Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose	% Hemmung praeoperativ/postoperativ	
18	50	w	Cyst. Mastopathie, Prechtel I	+ 5,6	+ 12,1
19	47	w	Cyst. Mastopathie, Prechtel I	+ 10,3	+ 8,7
20	43	w	Fibroandenoma intracaniculare	+ 7,1	+ 11,1
21	44	w	Fibrocystische Mastopathie, Prechtel I	+ 4,3	+ 8,7
22	39	w	Cyst. Mastopathie, Prechtel III	+ 22,6	+ 24,5
23	70	w	Cyst. Mastopathie, Prechtel I	+ 20,5	+ 13,6
24	31	w	Fibrocystische Mastopathie, Prechtel I	+ 13,2	+ 10,3
25	47	w	Cyst. Mastopathie, Prechtel I	+ 8,5	+ 4,4

Statistische Kenngrößen:

Zahl der Messungen: $n = 38$

Arithmetisches Mittel: $\bar{x} = 5{,}8\ \%$

Standardabweichung: $1 = \pm 5{,}7$

MALIGNE ERKRANKUNGEN DER MAMMA

Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose	% Hemmung prae-operativ	% Hemmung post-operativ
1	72	w	Infiltrierendes Ca $T_1N_1M_1$	+ 13,3	
2	64	w	Hautmetastasen nach Mamma Ca li $T_1N_1M_o$ 1965, re $T_1N_1M_o$ 1976	+ 17,9	
3	63	w	Scirrhöses Ca $T_{2A}N_oM_o$	+ 11,8	
4	76	w	Solides Ca $T_1N_oM_o$	+ 11,4	
5	50	w	Scirrhöses Ca $T_1N_oM_o$	+ 3,7	
6	33	w	Medulläres Ca $T_4N_1M_o$	+ 15,7	
7	72	w	Infiltrierendes Ca $T_{2A}N_1M_o$	+ 14,3	
8	43	w	Carc. simpl. solid. $T_1N_oM_o$	+ 19,6	
9	38	w	Carc. simpl. solid. $T_2N_1M_o$	+ 21,5	
10	44	w	Adenoca. $T_1N_oM_o$	+ 11,8	+ 17,7
11	55	w	Solides Ca $T_1N_1M_o$	+ 21,7	+ 16,9
12	50	w	Solides Ca $T_1N_1M_o$	+ 14,6	+ 25,5
13	55	w	Scirrhöse Ca $T_1N_1M_o$	+ 6,3	+ 20,4 *
14	64	w	Solides Ca $T_2N_1M_o$	+ 16,1	+ 10,7
15	43	w	Solides Ca $T_{3B}N_1M_o$	+ 19,0	+ 14,7

MALIGNE ERKRANKUNGEN DER MAMMA

Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose	% Hemmung prae-operativ	% Hemmung post-operativ
16	32	w	Infiltrierendes Ca $T_{2A}N_1M_o$	+ 17,0	+ 16,6
17	65	w	Infiltrierendes Ca $T_{2A}N_1M_o$	+ 13,5	+ 10,9
18	48	w	Adenoca. $T_2N_1M_o$	+ 5,3	+ 9,8 *
19	73	w	Solides Ca re $T_2N_oM_o$	+ 10,8	+ 14,2
20	62	w	Infiltrierendes Ca $T_{2A}N_1M_o$	+ 9,8	+ 16,4

* Diesen Messungen liegt eine doppelte Lymphocytenkonzentration zu Grunde.

Statistische Kenngrößen:

Zahl der Messungen: $n = 31$

Arithmetisches Mittel: $\bar{x} = 16,0\ \%$

Standardabweichung: $1 = \pm 4,9$

III.3 Erläuterungen zu den Messwerten

A) Kontrollpersonen:

Es wurden 25 Probanden untersucht. Die Zahl der Messungen betrug n= 25. Wird die Grenze zwischen gutartigen und bösartigen Erkrankungen bei einer Hemmung von + 10,0 % festgelegt, so ergibt sich bei 21 Messungen (84 %) eine Übereinstimmung der zytopherometrischen Bestimmung mit der Diagnose, in 4 Fällen (16 %) sind die Ergebnisse als falsch positiv zu bezeichnen.

B) Benigne Tumoren:

Die Lymphocyten von 25 Patientinnen wurden untersucht. Die Zahl der Messungen betrug n= 38, davon sind 25 Messungen prae- und 13 Messungen postoperativ vorgenommen worden.
Die Rate der richtigen Bestimmungen liegt bei 68,5 %. Als falsch positiv müssen 31,5 % der Ergebnisse gelten.
Eine Aufteilung der in dieser Gruppe vorkommenden Erkrankungen gemäß der Klassifikation der WHO (36) ergibt, daß die Krankheiten von 19 Patientinnen zum Formenkreis der Mastopathie zu rechnen sind und daß die Tumoren von 6 Patientinnen zu den gutartigen Brustdrüsengeschwülsten gehören.
Das Mittel der Meßwerte der Erkrankungen aus dem Formenkreis der Mastopathie liegt bei $\bar{x}$ = 8,7 % Hemmung, das Mittel der Meßwerte der gutartigen Geschwülste beträgt $\bar{x}$ = 3,7 % Hemmung.
Eine weitere Unterteilung der Ergebnisse aus dem Formenkreis der Mastopathie nach den Prechtelgraden I und II/III ergibt für Grad I ein arithm. Mittel von $\bar{x}$ = 7,4 % und für die Grade II/III ein arithm. Mittel von $\bar{x}$ = 20,3 % Hemmung.

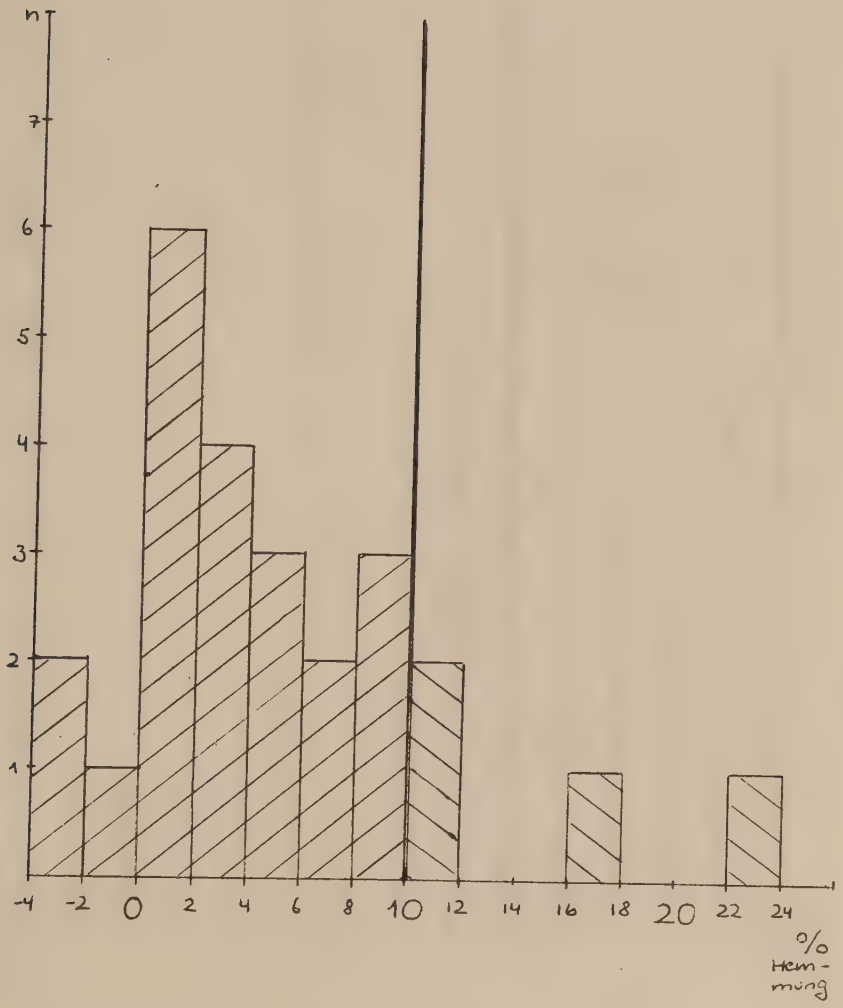
C) Maligne Tumoren:

Es wurden 25 Probanden untersucht. die Rate der richtigen Bestimmungen liegt bei 83,9 %, die der falsch negativen bei

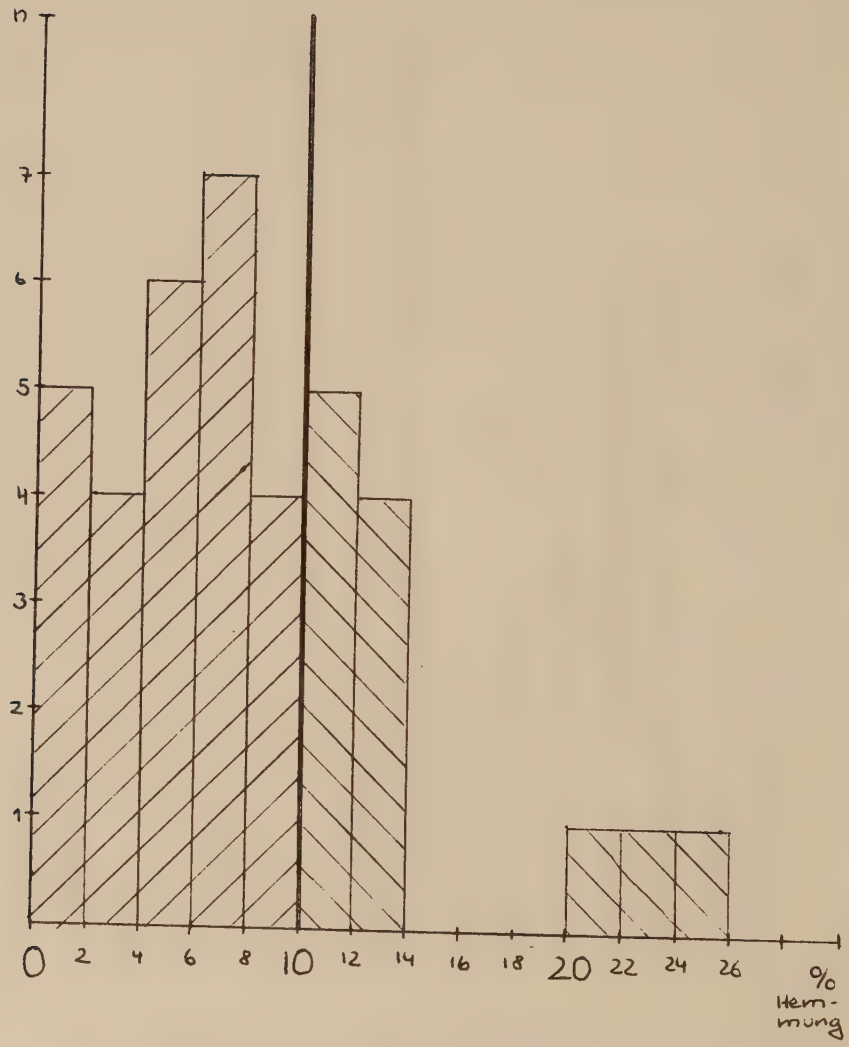
16,1 %. Die Zahl der Messungen beträgt n = 31, davon sind 20 Messungen praeoperativ und 11 postoperativ vorgenommen worden.

III.4 Schaubilder

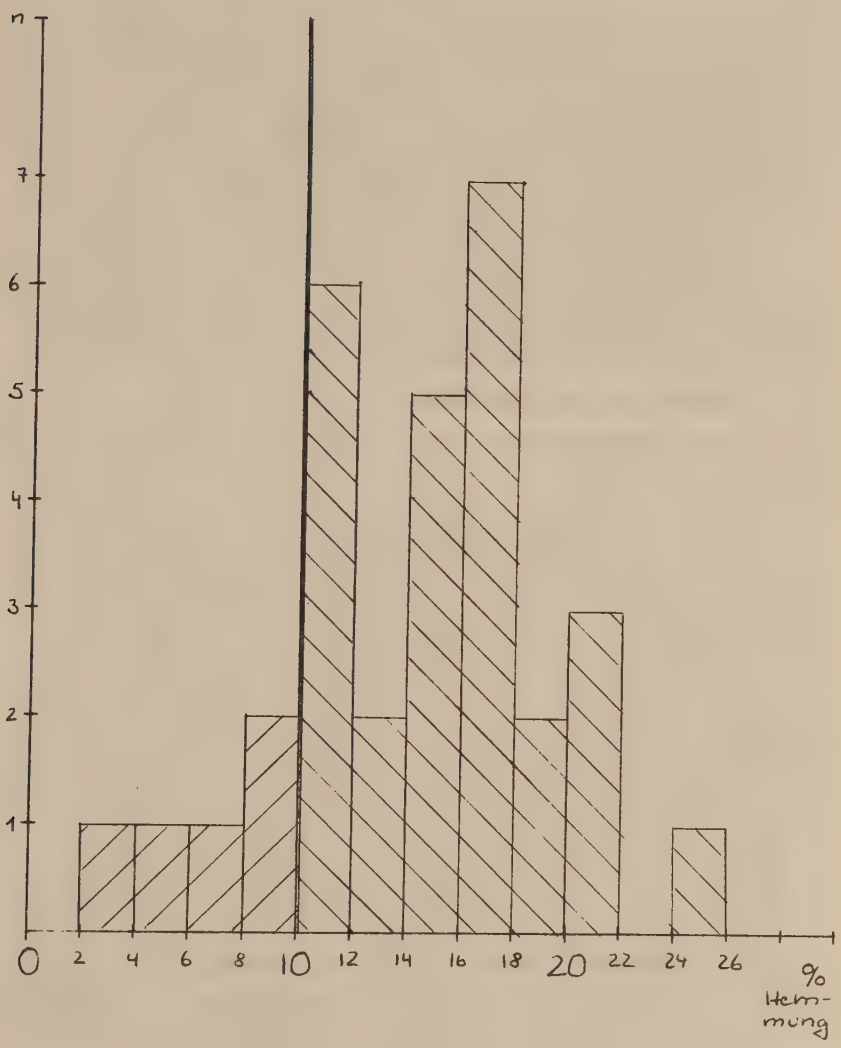
A) Kontrollgruppe



B) Gruppe der benignen Erkrankungen der Mamma



C) Gruppe der malignen Erkrankungen der Mamma



IV Diskussion

IV.1 Entwicklung der Methode

Der Nachweis von immunologischen Reaktionen durch die Zellelektrophorese wurde erstmals im Jahre 1967 durch Sundaram et al. (42) an Lymphknotenzellen erbracht. Im Jahre 1970 machten Caspary und Field (7) die Entdeckung, daß die Lymphocyten von Malignomträgern bei einer in vitro vorgenommenen Restimulierung mit dem encephalitogenen Faktor (EF) eine Substanz freisetzten, die - von ihnen Makrophage-Slowing-Faktor genannt - die Wanderungsgeschwindigkeit von Makrophagen im elektrischen Feld verlangsamte. Die von Caspary und Field erzielten Ergebnisse (7,10) wurden durch eine größere Zahl von Untersuchern bestätigt (16,33).
Bei diesen Untersuchungen wurden - gemäß der von Caspary und Field entwickelten Methode - als Indikatorzellen lebende Makrophagen verwendet, die nach Stimulation mit Paraffinöl aus dem Peritonealexsudat von Meerschweinchen gewonnen wurden. Die aus dem Peritonealexsudat gewonnenen Zellen stellten eine morphologisch und funktionell heterogene Zellpopulation dar (23,39). In dem Exsudat befanden sich neben den Makrophagen noch Lymphocyten, Granulocyten und Monocyten. Die gewonnenen Makrophagen besaßen einen unterschiedlichen Gehalt an Ölvakuolen im Cytoplasma (39). Auf der Verwendung dieser Makrophagen beruhte wahrscheinlich ein großer Teil der sich ergebenden methodischen Schwierigkeiten und der langen Einarbeitungszeit, die von Caspary und Field mit 2-3 Monaten angegeben wurde (7). Es bedurfte einiger Übung, um im Zytopherometer eine homogene Makrophagenstichprobe zu identifizieren und deren Wanderungsgeschwindigkeit zu messen. Erst dann war es möglich, reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen.
Eine wesentliche Vereinfachung und leichtere Handhabung erfuhr der Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitätstest durch Porzsolt et al.

(30), indem sie tannierte und sulphosalizylsäure stabilisierte Hammelerythrocyten (ETS) anstelle von Makrophagen als Indikatorzellen einführten. Die Herstellung der ETS-Zellen wurde standardisiert und es wurde möglich, eine große Anzahl von Zellen herzustellen, die ohne Funktionsbeeinträchtigung über lange Zeit aufbewahrt werden konnten. Durch die homogene Zusammensetzung der Indikatorzellsuspension wurde die zytopherometrische Messung wesentlich vereinfacht. Porzsolt et al. (30) erreichten bei der Untersuchung von malignen Tumoren mit dem modifizierten EM-Test eine Trefferquote von 87 % richtig diagnostizierter Carcinome. Die Autoren konnten damit nachweisen, daß die Aussagekraft des Testes auch bei der Verwendung dieses neuen Zellindikatorsystems erhalten blieb.

IV.2 Interpretation der Ergebnisse

Die von Porzsolt et al. (30) berichteten Vorteile der modifizierten Methode und insbesondere die Treffsicherheit bei der Erkennung maligner Tumoren können durch die vorliegende Arbeit mit einem Ergebnis von 84 % richtig diagnostizierter Carcinome bestätigt werden. Bei 5 Messungen (16 %) ist das Ergebnis als falsch-negativ zu bezeichnen. Nach Caspary und Field (8) könnte das Auftreten von falsch-negativen Ergebnissen durch die Bildung eines "lymphocyte depressive factor" bei fortgeschrittenen malignen Tumoren erklärt werden. Diese Hypothese könnte für die Interpretation der Messungen bei Patientin Nr. 13 und 18 herangezogen werden. Bei diesen beiden Patientinnen wurde nach der praeoperativen Messung, die jeweils ein negatives Testergebnis erbrachte, die Lymphocytenkonzentration bei der postoperativen Bestimmung verdoppelt. Dieser Maßnahme liegt die Vorstellung zugrunde, daß nicht jede Lymphocytenstichprobe die gleiche Menge

sensibilisierter Lymphocyten enthält und infolgedessen durch eine Erhöhung der Lymphocytenkonzentration eine Vermehrung des Gehalts an sensibilisierten Lymphocyten erreicht werden kann (22). Die postoperative Messung erbrachte in beiden Fällen eine vermehrte Hemmung, die bei der Patientin Nr. 13 stark (6,3 % / 20,4 %) und bei der Patientin Nr. 18 (5,3 % / §,8 %) weniger stark ausgeprägt war.

Die bei der zytopherometrischen Untersuchung ermittelten Doppelwerte einer Person weisen eine gewisse Streuung auf. Die bei Patientin Nr. 20 auftretende Differenz zwischen prae- und postoperativer Messung (9,8 % / 16,4 %) kann als in diesem Streuungsbereich liegend betrachtet werden. Für das falsch-negative Ergebnis bei der Patientin Nr. 5 kann keine Erklärung gefunden werden.

In der Gruppe der Patientinnen mit gutartigen Erkrankungen der Brust wurde eine Treffsicherheit von 68,5 % erzielt, bei den Kontrollpersonen dagegen eine Quote von 84 %. Eine Aufteilung der falsch-positiven Ergebnisse innerhalb der Gruppe der gutartigen Erkrankungen der Brust ergibt, daß 91,6 % der falsch-positiven Werte dem Formenkreis der Mastopathie und 8,4 % den benignen Tumoren zuzurechnen sind. Innerhalb der Erkrankungen aus dem Formenkreis der Mastopathie zeigen die Patientinnen mit den Prechtelgraden II/III eine ausgeprägtere Hemmung der Wanderungszeit der Indikatorzellen auf ($\bar{x}$= 20,3 %) als die Patientinnen mit dem Prechtelgrad I ($\bar{x}$= 7,4 %). Möglicherweise drückt sich in diesen Ergebnissen die Antwort des Immunsystems auf die Bildung des mastopathisch veränderten Gewebes aus.

Eine Erklärung für das Auftreten von falsch-positiven Ergebnissen bei den Frauen der Kontrollgruppe und der Gruppe der gutartigen Tumoren der Mamma könnte - in der entsprechenden Altersgruppe - möglicherweise auch in einer Abhängigkeit der Hemmung von den

hormonellen Veränderungen während des Menstruationszyklus bestehen (45).

Im übrigen darf bei der Interpretation der mit dem EM-Test erzielten Ergebnisse nicht außer acht gelassen werden, daß mit dieser Methode nicht nur maligne Erkrankungen erfaßt werden. Die von Field und Caspary nach den anfänglichen Malignomuntersuchungen geäußerte Hoffnung, mit dem Test eine empfindliche Methode für die immunologische Frühdiagnostik von Malignomen gefunden zu haben (9), erfüllte sich nämlich insofern nicht, als auch Erkrankungen des Nervensystems wie z.B. Multiple Sklerose und zerebellare Degeneration (14), des weiteren Infektionskrankheiten wie Tuberkulose, Grippe und Masern zu einem positiven Ergebnis führen (10,12,37,43). Auch werden positive Resultate bei Myasthenia gravis (13), Enteritis regionalis und Colitis ulcerosa (10) und Leukoplakia lingualis (14) gefunden. In neueren Arbeiten wird der EM-Test deshalb nicht mehr als eine spezifische Methode zur Früherkennung von Malignomen, sondern als Methode zur Erfassung von sensibilisierten Lymphocyten bezeichnet (14,27).

Diese Vielzahl von Erkrankungen, die bei Anwendung des EM-Testes zu einer Hemmung der Migrationsgeschwindigkeit der Indikatorzellen führen, erschweren die Interpretation der gewonnenen Ergebnisse. Insbesondere das durch einige Autoren berichtete positive Testergebnis bei Infektionskrankheiten (10,12,37,43,44) stellt einen Unsicherheitsfaktor dar, der allerdings durch eine zweite zytopherometrische Messung kurze Zeit nach Abklingen der klinischen Symptome beseitigt werden kann. Auf diesen Sachverhalt weisen Ch. Tautz und G. Schneider hin (37,44). Sie beschreiben daß schon nach Tagen bzw. wenigen Wochen nach Abklingen der Symptomatik keine Migrationshemmung mehr nachzuweisen war. Demgegenüber bleibt bei Malignomträgern auch nach Entfernung des Tumors die Migrationshemmung über Jahre hinweg erhalten (7). Aus

diesem Grund ist eine Erfolgskontrolle der Therapie - z.B. nach chirurgischer Resektion - mit Hilfe des EM-Testes nicht möglich.

Wird bei der Anwendung des EM-Testes in der vorliegenden Form eine hohe Migrationshemmung festgestellt, so kann aus dem Testergebnis nicht auf eine bestimmte Organlokalisation eines Malignoms geschlossen werden. Die sensibilisierten Lymphocyten von Patienten mit verschiedenen Malignomen reagieren nach Kontakt mit dem encephalitogenen Faktor gleichförmig mit der Freisetzung von Lymphokinen, die zur Hemmung der Migrationsgeschwindigkeit der Indikatorzellen führen. Der Test liefert also in der hier durchgeführten Weise keine spezifischen Daten, aus denen auf die Art und den Ort eines Malignoms geschlossen werden könnte. Vielmehr muß die Interpretation der gewonnenen Ergebnisse unter Heranziehung der klinischen Untersuchungsergebnisse und der übrigen diagnostischen Methoden vorgenommen werden.
Erste Versuche, mit Hilfe des EM-Testes eine differentialdiagnostische Aussage über die Art des vorliegenden Malignoms zu machen, sind schon unternommen worden. Dazu wurden aus verschiedenen Malignomen Proteine isoliert und anschließend die Lymphocyten eines Probanden mit einer Reihe von Antigenen stimuliert. Es zeigte sich, daß bei der Stimulierung mit dem dem Malignom homologen Antigen die größte Hemmung erzielt wurde (28).
In der vorliegenden Form des EM-Testes besteht der große Vorteil des Verfahrens darin, daß nach Ausschluß der oben erwähnten Erkrankungen mit hoher Verläßlichkeit und unter geringer Belastung des Patienten eine Aussage darüber gemacht werden kann, ob es sich bei einer Erkrankung um ein benignes oder malignes Geschehen handeln könnte.

IV.3 Technische Probleme bei der Durchführung der zytopherometrischen Messung

Die während der Durchführung der vorliegenden Untersuchung aufgetretenen technischen Schwierigkeiten entstanden hauptsächlich aus der Anwendung des Zytopherometers. Wegen der auftretenden Turbulenzen mußten die Proben häufig mehrere Male in die Meßkammer eingebracht werden bis die Wanderungsgeschwindigkeit der Indikatorzellen für beide Richtungen ungefähr gleich groß war. In einigen Fällen blieben aber selbst nach diesem Vorgehen die Unterschiede in den Wanderungszeiten für beide Richtungen so groß, daß die Proben nicht ausgewertet werden konnten. Bei wenigen Versuchen wurde eine Verklumpung der Indikatorzellen beobachtet, die die zytopherometrische Messung unmöglich machte.
Eine technische Weiterentwicklung des Zytopherometers würde den Zeitaufwand für den Untersuchungsgang verkürzen und möglicherweise zu einer höheren Empfindlichkeit der Methode führen.

IV.4 Vergleich mit der Treffsicherheit anderer diagnostischer Methoden

Die Angaben über die Treffsicherheit der verschiedenen diagnostischen Methoden bei der Untersuchung des Mammacarcinoms schwanken erheblich. Stützt sich die Diagnose auf die Inspektion und die Palpation so bewegt sich die durchschnittliche Aussagefähigkeit zwischen 68-85 % richtig diagnostizierter Carcinome (15). Eine Untersuchung von Bjurstam et al. (3) über die Abhängigkeit der Treffsicherheit von der Tumorgröße bei der palpatorischen Untersuchung zeigte, daß im Stadium T_1 14 %, im Stadium T_2 65 %, im Stadium T_3 90 % und im Stadium T_4 100 % richtiger Aussagen gemacht wurden. Aus der Untersuchung geht hervor, daß kleine Ma-

lignome nur schwer mit der Palpation zu erfassen sind. Insgesamt werden etwa 2/3 aller Mammacarcinome allein mit Hilfe der klinischen Untersuchung aufgedeckt (34).

Neben den klinischen Methoden der Untersuchung stellt derzeit zweifellos die Mammographie die bedeutendste diagnostische Methode zur Aufdeckung des Mamma-Carcinoms dar.

Die durchschnittliche Treffsicherheit der Mammographie wird von den meisten Autoren mit Werten zwischen 85-95 % richtig diagnostizierter Malignome angegeben (3,15,38). Die Rate der falschpositiven Ergebnisse beträgt nach D. Schoen etwa 14 % (38). Die Treffsicherheit dieser Methode liegt bei Frauen, die das 50. Lebensjahr überschritten haben, bei allen Tumorstadien um bzw. über 90 %, bei Frauen unter 50 Jahren in Abhängigkeit vom Tumorstadium zwischen 60 % (T_1) und 75 % (T_{2+3}) richtig diagnostizierter Mammacarcinome (38). Die diagnostische Präzision der Mammographie hängt also vom Lebensalter der Patientinnen ab und ist bei jüngeren Frauen unbefriedigend.

Die von Wolfe et al. (1971) postulierte Überlegenheit der Xeroradiographie gegenüber der Mammographie konnte von anderen Autoren nicht bestätigt werden (15,20,46).

Wolfe erzielte bei malignen Tumoren eine korrekte Diagnose in 84,3 % der Fälle, bei benignen Tumoren in 75,5 % der Fälle. Eine endgültige Bewertung dieser Methode scheint derzeit noch nicht möglich.

Bei pathologischer Sekretion der Brust ermöglicht die Galaktographie eine Lokalisation des sezernierenden Brustdrüsensegmentes und die Aufdeckung duktaler Veränderungen. Eine Differenzierung zwischen Papillom und Carcinom wird histologisch vorgenommen. Eine sezernierende Mamma tritt bei 2-5 % der bösartigen Veränderungen auf (18,38). Bei diesen Malignomen handelt es sich um intraduktal lokalisierte Tumoren, die in etwa der Hälfte der Fälle allein durch

die Anwendung der Galaktographie zur Diagnose kommen (15).

Bei entsprechender Symptomatik handelt es sich um eine wertvolle Methode.
Zur mikroskopischen Diagnose des Mammacarcinoms stehen eine Reihe von Verfahren zur Verfügung, die sich jedoch hinsichtlich der Aussagekraft unterscheiden. Das sicherste Verfahren mit einer fast 100 %igen Treffsicherheit ist die Excisionsbiopsie, die eine optimale Bewertung mit genauer Typisierung der Geschwulst ermöglicht (41).
Vergleicht man die Treffsicherheit, die bei der Anwendung des EM-Testes erzielt wird, mit der der eben beschriebenen Verfahren, so zeigt sich, daß der EM-Test als eine sensible Methode für die Diagnostik des Mammacarcinoms gelten kann.

IV.5 Schlußbemerkungen

Solange sich der EM-Test noch in der Entwicklungsphase befindet und mit dem Verfahren keine Aussage über Art und Lokalisation eines Malignoms gemacht werden kann, sollte die Methode in der Mammacarcinomdiagnostik lediglich als zusätzliche Untersuchungsmethode eingesetzt werden. Die Tatsache, daß die Kenntnisse über den Wirkungsmechanismus und über die Art des von den Lymphocyten gebildeten Slowing-Faktor noch ungenügend sind, erfordert weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet. Die Kenntnis der Störfaktoren ist Voraussetzung, um eine ausreichende Interpretation der mit dem Test erzielten Ergebnisse vornehmen zu können. Deswegen müssen weitere Anstrenungen in dieser Richtung unternommen werden. Der Zeitaufwand für die Durchführung der Untersuchungen ist beträchtlich. Durch eine Verbesserung des Zytopherometers könnte möglicherweise ein Fortschritt erzielt werden.

V. Zusammenfassung

Der Elektrophorese-Mobilitätstest ist ein empfindliches in-vitro Verfahren zum Nachweis von sensibilisierten Lymphocyten. Im Jahre 1970 machten Caspary und Field die Entdeckung, daß die Lymphocyten von Malignomträgern nach Stimulierung mit dem encephalitogenen Faktor (EF) - einem basischen Myelinprotein - einen Mediator bilden, der die Wanderungsgeschwindigkeit von Makrophagen im elektrischen Feld verlangsamt. Infolge der Einführung von tannierten und mit Sulphosalicylsäure stabilisierten Erythrocyten durch Porzsolt et al. als Indikatorzellen anstelle der bisher verwendeten Meerschweinchenmakrophagen, erfuhr der Test eine wesentliche Vereinfachung und leichtere Handhabung.

Der EM-Test führt allerdings nicht nur bei malignen Erkrankungen zu einem positiven Ergebnis, sondern z.B. auch bei Infektionskrankheiten und degenerativen Hirnerkrankungen. Dieser Sachverhalt erschwert die Interpretation der gewonnenen Ergebnisse.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei den malignen Geschwüren der Brust eine Trefferquote von 84 % richtiger Diagnosen erreicht, in der Gruppe der Kontrollpersonen ergab sich ebenfalls eine Rate von 84 % richtiger Ergebnisse. Bei den gutartigen Erkrankungen der Brust lag die Quote der richtigen Bestimmungen bei 68,5 %.

Der Vergleich der mit dem EM-Test erzielten Ergebnisse mit den anderen Verfahren, die in der Diagnostik des Mammacarcinoms Anwendung finden zeigt, daß der EM-Test ein wertvolles Zusatzverfahren darstellt.

VI. Quellenverzeichnis

(1) BECHT, H.: Properties of erythrocytes stabilized with sulfosacylic acid and their use in an indirect hemagglutination test with influenza virus RNP-antigen. J. Immunology 101, 18-22 (1968).

(2) BENNINGHOff, D. and TSIEN, K.C.: Treatment and survival in breast cancer: a review of results. Brit. J. Radiol. 32, 450-454 (1959).

(3) BJURSTAM, N., HEDBERG, K.A., HULTBORN, A., JOHANSSON, N., and JOHNSEN, C.: Diagnosis of breast carcinoma. Basel: Karger 1974.

(4) CASPARY, E.A.: The mechanism of antigen-induced electrophoretic mobility reduction of guinea-pig macrophages. Clin. exp. Immun. 11, 305-309 (1972).

(5) CASPARY, E.A. and FIELD, E.J.: An encephalitogenic protein of human origin; some chemical and biological properties. Ann. N.Y. Acad. Sci. 122, 182-198 (1965).

(6) CASPARY, E.A. and FIELD, E.J.: Specific lymphocyte sensitization in cancer: Is there a common antigen in human malignant neoplasia? Brit. med. J. 2, 623-617 (1971).

(7) FIELD, E.J. and CASPARY, E.A.: Lymphocyte sensitization: An in-vitro test for cancer? Lancet 1970 II, 1337-1341.

(8) FIELD, E.J. and CASPARY, E.A.: Lymphocyte sensitization in advanced malignant disease: A study of serum lymphocyte depressive factor. Br. J. Cancer 26, 164-173 (1972).

(9) FIELD, E.J., CASPARY, E.A. and SHEPHERD, R.T.H.: Immunodiagnosis of cancer.
Br. med. J. 3, 641-642 (1972).

(10) FIELD, E.J., CASPARY, E.A. and SMITH, K.S.: Macrophage electrophoretic mobility (MEM) test in cancer: A criticual evaluation.
Brit. J. Cancer 28 Suppl. I, 208-214 (1973).

(11) FIELD, E.J., CASPARY, E.A., HALL, R. and CLARK, F.: Circulating sensitized lymphocytes in Graves disease.
Lancet 1970 I, 1144-1147.

(12) FIELD, E.J., CASPARY, E.A., SHENTON, B.K. and MADGWICK, H.: Lymphocyte sensitization after exposure to measles and influenza. Possible relevance to pathogenesis of multiple sclerosis.
J. neurol. Sci. 19, 179-187 (1973).

(13) FIELD, E.J., BATES, D., SHAW, D.A., GRIFFIN, S.G., SHENTON, B.K. and SMITH, K.: Lymphocyte sensitization in Myasthenia gravis: Function of the adult thymus gland.
Lancet 1973 II, 675-676.

(14) FIELD, E.J., SHENTON, B.K., MEYER-RIENECKER, H.J., JENSSON, H.L., KÖHLER, H., GÜNTHER, J.K. und FRIEMEL, H.: Die Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitäts- (MEM-) Methode: Ihre Anwendung in der klinischen Immunologie.
DT. Gesundh.-Wesen 30, 377-382 (1975).

(15) FRISCHBIER, H.J. und LOHBECK, H.U.: Frühdiagnostik des Mammacarcinoms.
Stuttgart: Thieme 1977

(16) GOLDSTONE, A.H., KERR, L. and IRVINE, W.J.: The macrophage electrophoretic migration test in cancer. Clin. exp. Immunol. 14, 469-472 (1973).

(17) HAAGENSEN, C.D. and COOLEY, E.: Treatment of early mammary carcinoma - a cooperatibe international study. Ann. Surg. 157, 157-179 (1963).

(18) HARNETT, W.A.: Atatistical report on 2529 cases of cancer of the breast. Brit. J. Cancer 2, 213 (1948).

(19) HEIM, W. und SIEWERT, R.: Früherkennung bösartiger Mammatumoren. Med. Welt 22/15, 583-587 (1971)

(20) HÜPPE, J.R.: Vergleichende Untersuchung mit Film- und Xeromammographie. Erste Erfahrungen. In: Deutscher Röntgenkongress, Baden-Baden 1974. Stuttgart: Thieme 1974.

(21) KWAPINSKI, J.B.G.: Methodology of immunochemical and immunological research. New York: Wiley-Interscience 1972.

(22) LAIER, E.: Befunde zum Wirkungsmechanismus des Elektrophorese-Mobilitäts- (EM-) Testes. Inauguraldissertation Tübingen 1977.

(23) LEWKONIA, R.M., KERR, E.J.L. and IRVINE, J.: Clinical evaluation of the macrophage electrophoretic mobility test for cancer. Br.J. Cancer 30, 532-537 (1974).

(24) MAASS, H.: Das Mammacarcinom Geburtsh. u. Frauenheilk. 28, 823-848 (1968).

(25) MARX, G. und WIDOW, W.: Früherkennung des Brustdrüsenkrebs.
In: GUMMEL, H. und WIDOW, W.: Symposium über den Brustdrüsenkrebs.
Berlin: Akademie Verlag 1973

(26) MCWHIRTER, R.: An anylysis of the treatment of breast cancer.
In: HALNAN, K.E.: Recent advances in Cancer and Radiotherapeutics.
London: Churchill 1972

(27) MEYER-RIENECKER, H., JENSSEN, L., KÖHLER, H. und GÜNTHER, J.K.:
Zur Bedeutung des Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitäts-(MEM-) Testes für die Diagnostik der Geschwülste des Zentralnervensystems.
Dtsch. med. Wschr. 100, 538-543 (1975).

(28) MÜLLER, M., IRMSCHER, J., FISCHER, R. und GROSSMANN, H.:
Immunologisches Tumorprofil.
Dt. Gesundh.-Wesen 30, 1836-1842 (1975).

(29) NAGEL, H. und GEIGER, C.: Krebs und Immunität.
Schweiz. med. Wschr. 101, 1605-1620 (1971).

(30) PORZSOLT, F., TAUTZ, C. and AX, W.: Electrophoretic mobility test: I. Modifications to simplify the detection of malignant diseases in man.
Behring Inst. Mitt. 57, 128-136 (1975).

(31) PORZSOLT, F., MÜHLBERGER, G. and AX, W.: Electrophoretic mobility test for precancerous diseases?
Behring Inst. Mitt. 57, 137-142 (1975).

(32) PREECE, A.W. and LIGHT, A.P.: The macrophage electrophoretic mobility (MEM) test for malignant disease. Further clinical investigations and studies on macrophage slowing factors.
Clin. exp. Immunol. 18, 543-552 (1947).

(33) PRITCHARD, J.A.V., MOORE, J.L. SUTHERLAND, W.H. and JOSLIN, C.A.F.: Macrophage-electrophoretic-mobility (MEM) test for malignant disease. An independent confirmation.
Lancet 1972 II, 627-629.

(34) RUMMEL, W., WEISHAAR, J., KINDERMANN, G.: Der Wert einer kombinierten Diagnostik der Mamma-Erkrankungen.
Arch. Gynäk. 211, 39-42 (1971).

(35) SACHS, H. und MAASS, H.: Neuere epidemiologische Gesichtspunkte zum Brustdrüsenkrebs der Frau.
Geburtsh. u. Frauenheilk. 29, 932 (1969).

(36) SCARFF, R.W. and TORLANI, H.: Histological typing of breast tumors.
World Health Organization, Genf 1968.

(37) SCHNEIDER, W.A.: Der Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitäts- (MEM) Test. Eine immunologische Methode zur Diagnose maligner Tumoren?.
Inauguraldissertation Tübingen 1976.

(38) SCHOEN, D.: Die radiologische Diagnostik des Mammacarcinoms.
Therapiewoche 23, 2292-2298 (1973).

(39) SHENTON, B.K., HUGHES, D. and FIELD, E.J.: Macrophage electrophoretic migration (MEM) test for lymphocyte sensitization: Some practical experiences in macrophage selection.
Br. J. Cancer 28 Suppl.I, 215-219 (1973).

(40) SHIMKIN, M.B.: Cancer of the breast.
Surg. Gynec. Obstet 94, 645-654 (1957).

(41) STEGNER, H.E.: Histopathologie des Mammacarcinoms und seiner Vorstadien.
Therapiewoche 26, 2276-2284 (1973).

(42) SUNDARAM, K., PHONDKE, G.P. and AMBROSE, E.J.: Electrophoretic mobilities of antigen-stimulated lymphnode cells.
Immunology 12, 21-26 (1967).

(43) TAUTZ, C. LAIER, E. und SCHNEIDER, W.: Der EM-Test: Ein hochsensibler Malignom-Test.
Mschr. Kinderheilk. 125, 216-218 (1977).

(44) TAUTZ, C., SCHNEIDER, W., LAIER, E. and BRÜGMANN, G.: The electrophoretic-mobility- (EM-) test: A methode for discrimination of malignant and non-malignant tumors.

(45) TAUTZ, C.: Persönliche Mitteilung.

(46) WOLFE, J.N., DOOLEY, L.E. und HERKINS, L.E.: Xeroradiographie der Brust: eine Vergleichsstudie mit konventioneller Filmmammographie.
Cancer (Philad.) 28, 1569-1573 (1971).

(47) Fa. ZEISS, Oberkochen: Bedienungsanleitung für das Zytopherometer.

(48) ZINSER, H.K.: Mammacarcinom. Diagnose und Differentialdiagnose.
Stuttgart: Thieme 1972.

DANK

Der experimentelle Teil der vorgelegten Arbeit wurde im Hämatologielabor der Kinderklinik der Universität Tübingen durchgeführt.

Mein herzlicher Dank gilt

Herrn Dr. med. Chr. Tautz, Kinderklinik der Universität Tübingen, der mir das Thema der Arbeit stellte und stets bereit war, theoretische und technische Probleme zu besprechen.

Herrn Prof. Dr. med. H.A. Hirsch, Geschäftsführender Direktor der Frauenklinik der Universität Tübingen, der mir die Untersuchung von Patientinnen mit benignen und malignen Erkrankungen der Mamma sowie mit anderen gynäkologischen Erkrankungen ermöglichte.

Frau Dr. med. E. Neeser, Frauenklinik der Universität Tübingen, die mir bei der praktischen Durchführung der Arbeit hilfreich zur Seite stand.

Lebenslauf

Am 11. Mai 1949 wurde ich, Kurt Jürgen Klaissle, als Sohn des Wilhelm Klaissle und seiner Ehefrau Lydia, geb. Hechler, in Freudenstadt geboren.

Nach dem Eintritt in die Grundschule in Freudenstadt und in das Kepler-Gymnasium Freudenstadt im Jahre 1956 bzw. 1960 wechselte ich im Jahre 1964 auf die Eduard-Spranger-Wirtschaftsschule Freudenstadt, wo ich im Juni 1968 die fachgebundene Hochschulreife erwarb. Im Jahre 1969 bestand ich vor dem Oberschulamt Stuttgart die Zusatzprüfung zur Erlangung der vollen Hochschulreife.

Nach Erlernen der griechischen und hebräischen Sprache begann ich im Wintersemester 1970/71 mit dem Studium der Theologie und Psychologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Im Wintersemester 1972/73 wechselte ich in das Fach Medizin an der Universität Tübingen über, wo ich im März 1975 die ärztliche Vorprüfung bestand. Den ersten und zweiten Teil der ärztlichen Prüfung legte ich im März 1976 bzw. 1978 ab. Im Mai des Jahres 1976 begann ich mit den Versuchen für meine Dissertation. Das Medizinstudium schloß ich am 2. Mai 1979 mit der 3. ärztlichen Prüfung ab.